

研究报告

核酸探针传感器的构建*

陈誉华 宋今丹

李大为

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001)

(沈阳东宇电子所, 沈阳 110003)

摘要 依据石英振子的晶体谐振频率是其表面沉积物的函数, 建立了简便、特异、敏感性达 100 pg, 并能对受检样品相对定量的核酸杂交检测新方法, 即压电晶体式核酸探针传感器。该方法的主要特点是以快速、敏感的频变信息作为核酸杂交的显示系统。

关键词 核酸杂交, 生物传感器, 压电晶体

核酸杂交技术是进行分子生物学研究的重要方法之一, 因之围绕该技术的新方法的研究一直是人们感兴趣的问题。近年来, 人们在不断地改进和建立新的核酸杂交类型与检测方法过程中已开始注意到开发 DNA 生物传感器^[1~4], 但迄今这方面的工作还处于探索阶段, 许多研究内容尚不完善。我们跟踪国外进展, 以单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 特异的、HSV 型共同性 F 片段^[5,6] 为探针, 建立了核酸杂交检测新方法——核酸探针传感器。

1 材料与方法

1.1 生物材料与试剂

HSV-1 (SM44)、HSV-2 (Sav)、巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV)、水痘带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 及 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 标准株引自中国预防医学科学院病毒学研究所。人疱疹病毒 6 型 (human herpes virus, HHV-6) 为中国医科大学微生物研究室分离保存^[7]。γ-氨基丙基三氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxy-silane, γ-APTES)、BSA、蛋白酶 K、RNase、内切酶 EcoRI 系美国 Sigma 公司产品。琼脂糖、溴化乙锭、Fico11400、SDS、Tris、聚乙烯吡咯烷酮购自上海化学试剂采购供应站 (进口分装)。

地高辛标记与检测盒系德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 电传感装置材料

3000xi 型电源系美国 Bio-rad 公司产品。频率计系台湾 GOOD WILL INSTRUMENT COLTD (GW) 公司产品。屏蔽箱、数据采集卡、压电晶体 (AT 切型、镀金、基础频率为 10MHz) 振荡电路模块等, 市售。

1.3 核酸的提取与核酸探针的制备

将 HSV-1 接种于原代兔肾单层细胞培养, 至细胞病变达 75% ~ 100% 时, 收集病变细胞, 按我们修改后的 Mocarski 法^[5] 提取 HSV-1 DNA; HSV-2、CMV、EBV、VZV、HHV-6 DNA 参照 Vonsover 等^[8] 的方法提取; 兔肾细胞与人白细胞 DNA 提取详见文献^[9]。以内切酶 EcoR I 水解 HSV-1 DNA, 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下用小刀切下带有 HSV-1 DNA EcoR I F 片段的凝胶条带, 电泳回收 F 片段。

1.4 压电晶体表面的修饰与 DNA 固定化

以表面覆有金膜 (0.3 cm²) 的压电晶体为阳极, Ag/AgCl 电极为阴极, 在 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中电解, 以氧化金膜。氧化后取出压电晶体, 置 2% γ-APTES 丙酮溶液中

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1995-12-04, 修回日期: 1996-07-08

1 h, 之后, 放室温干燥 2 h. 接着, 将压电晶体放入微型的架桥电泳槽中, 在电泳液 (Tris 硼酸缓冲液) 中加入变性的单链 HSV-1 DNA EcoR I F 片段, 压电晶体作阳极, 铂丝作阴极, 电泳, 使单链 DNA 富集在压电晶体表面, 借紫外交联将 DNA 固定在晶体上. 以 $1 \times \text{TBE}$ 、预杂交液、去离子水清洗后应用扫描电镜观察 DNA 固定否.

将上述观察后的晶体放入含变性 HSV-1 DNA 的杂交液中反应 2 h (43°C), 取出晶体, 依次用 $2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS, $0.2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS, $0.1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 及去离子水各洗 2 次, 每次 2 min (室温下). 干燥后进

行扫描电镜观察.

应用地高辛标记 DNA 的酶免疫显色法检测 DNA 固定于晶体表面的量, 即先用地高辛标记 DNA (随机引物法), 然后将标记的 DNA (单链) 加入 TBE 缓冲液中, 通过检查电泳前后溶液以及清洗液中的 DNA 量来确定之.

1.5 核酸探针传感器的构建和影响因素

用两片集成电路芯片 74HCT04 和 74HCT00 构成差动振荡电路, 晶振 XTAL1 为参比传感器, XTAL2 为基因传感器, 两组频率信号经与非门相差得到频率差值 Δf , 由数字频率计检测、经 GP-IB 总线接口进入微机进行处理 (图 1).

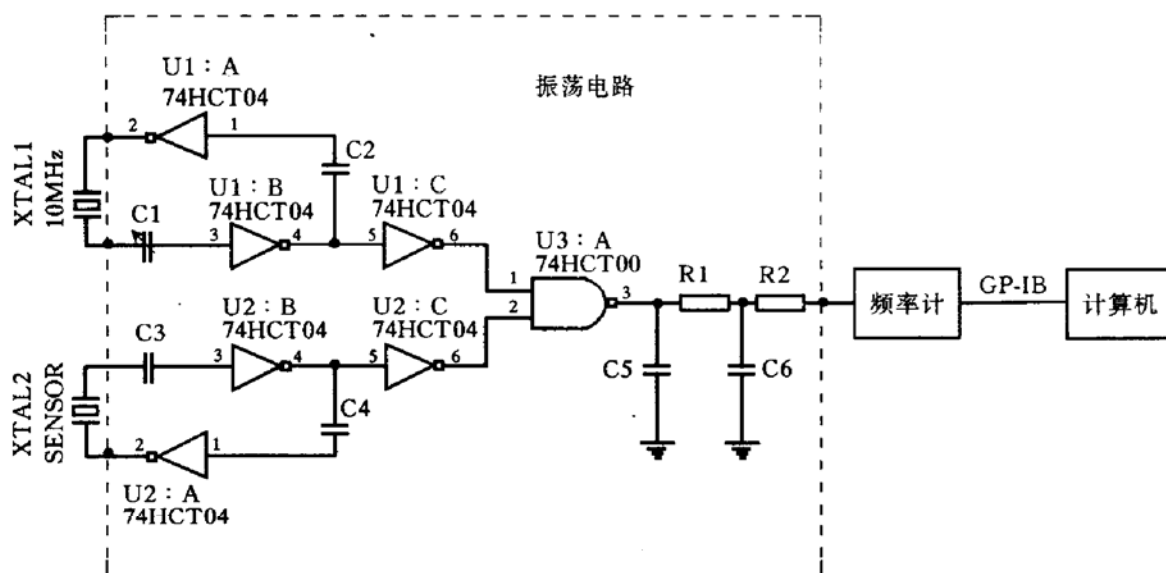


图 1 核酸检测系统构成

以上述方法固化有单链 DNA (F 片段) 的压电晶体分别于 $1 \times \text{TBE}$ 、 $2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS, $0.2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS, $0.1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 及去离子水中各洗 2 次 (室温, 每次 2 min), 干燥后作为核酸传感器进行测量, 记作 f_1 . 然后将该晶体放入含单链 HSV DNA 的杂交液中, 依次于杂交后 2、4、6、8、12 及 16 h 取出, 按上述洗晶体并测定频率, 记作 f_2 . 如此, 分别测定固化有 F 片段单链 DNA 的压电晶体于含 HSV-1、HSV-2、CMV、VZV、EBV、HHV-6、兔及人细胞单链 DNA (均为 $1 \mu\text{g}$) 及含不同浓度 HSV-1 单

链 DNA (1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 10^{-5} 及 $10^{-6} \mu\text{g}$) 的杂交液中反应 8 h 后的频率值, 记作 f_2 .

1.6 核酸探针传感器的再生

把杂交后的压电晶体放入 0.25 mol/L HCl 中 15 min, 0.5 mol/L 的 NaOH 中 10 min, 用去离子水洗三次后测频率值, 记作 f_3 . 接着, 再将此电压晶体置杂交液中反应 8 h 后测频率值, 记作 f_4 .

1.7 多重核酸探针传感器的初步研究

按上述方法将 HBV DNA、pBR322 及 HSV-1 DNA EcoR I F 片段的混合 DNA 固定

于压电晶体上, 之后测杂交液中分别含 HSV-1、HBV 和 pBR322 的频率值以及同时含 HSV-1、HBV 和 pBR322 DNA 的频率值。

2 结 果

2.1 DNA 在压电晶体表面的固定化

扫描电镜观察到本实验方法能将 DNA 固

定在压电晶体表面 (图 2)。地高辛标记 DNA 的免疫酶染色结果可将约 50% 的 DNA 固化到压电晶体上 (图 3)。

2.2 核酸探针传感器的响应时间

检测结果显示, 杂交后 2 h 即出现频率响应, 至 8 h 最大, 此后维持不变 (图 4)。

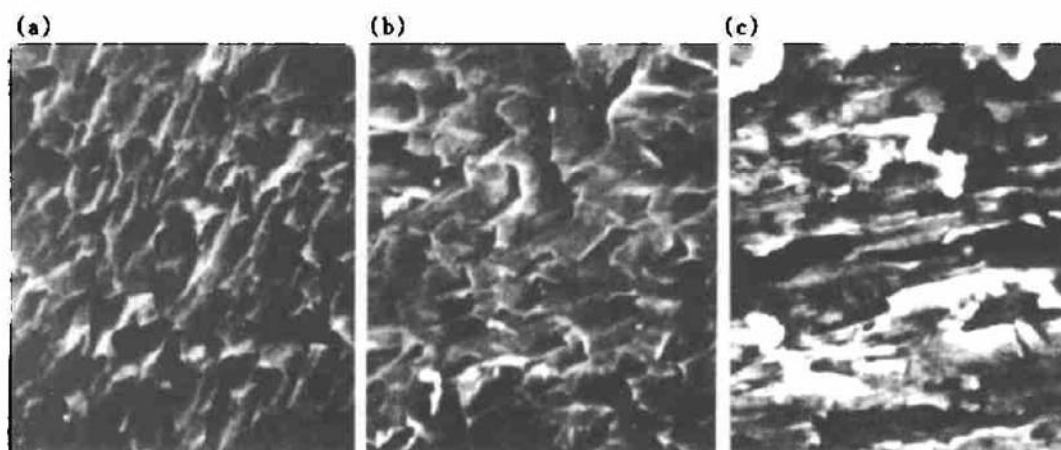


图 2 DNA 交联的扫描电镜观察

(a) 未交联 (固化) DNA; (b) 固化的单链 DNA (杂交前); (c) 杂交后, 放大倍数: 3300 倍。

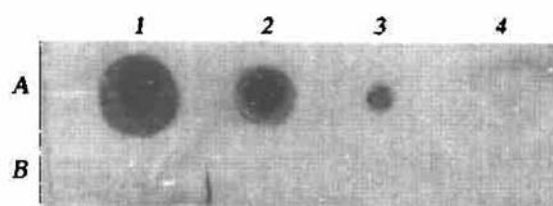


图 3 不同溶液中地高辛标记的 DNA 的免疫酶染色结果

示 DNA 固化到压电晶体上的量。A1: 电转移之前; A2: 电转移之后; A3: $1 \times \text{TBE}$ 洗一次; A4: $1 \times \text{TBE}$ 洗二次; B1: 预杂交液洗一次; B2~B4: 去离子水洗三次。

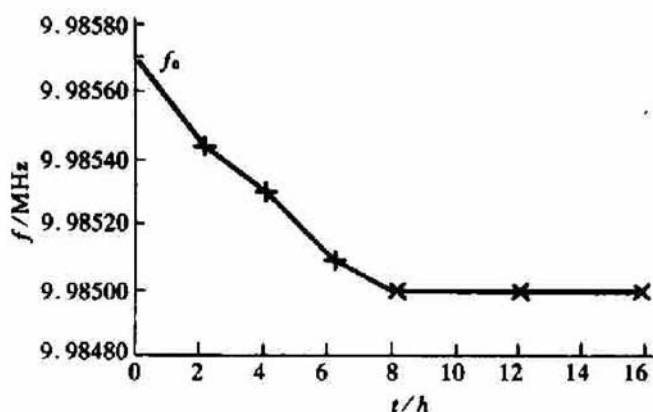


图 4 核酸探针传感器的响应曲线

f_0 为基础频率。

2.3 核酸探针传感器的特异性及再生

如表 1 所示, 除 HSV DNA 外, 与其他 DNA 杂交后频率无变化 (个别的有升高), 表明核酸探针传感器具有很高的特异性; 经酸、碱变性后, 核酸探针传感器可再生。

表 1 不同反应底物不同条件下杂交前后的频率变化 $\times 10^6 \text{ MHz}$

底物 (DNA $1 \mu\text{g}$)	f_1	f_2	f_3	f_4
HSV-1	9.98182	9.98090	9.98185	9.98098
HSV-2	9.98497	9.98374	9.98450	9.98376
CMV	9.98255	9.98256		
EBV	9.98637	9.98637		
VZV	9.98990	9.98992		
HHV-6	9.97832	9.97838		
兔	9.98420	9.98420		
人	9.98613	9.98615		

注: 示核酸探针传感器的特异性和再生。

2.4 核酸探针传感器的敏感性

核酸探针传感器的敏感度达 100 pg, 随受检样品 DNA 浓度的增加, 核酸探针传感器测出的频率 Δf 呈线性增加 (图 5)。

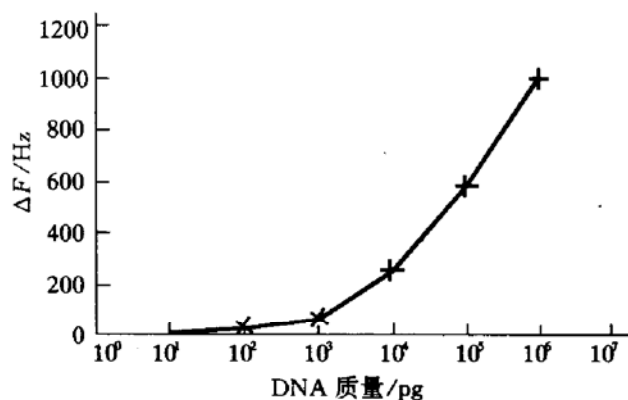


图 5 响应信号与受检 DNA 浓度的关系

示核酸探针传感器的敏感性与对受检样品 DNA 的相对定量。

2.5 核酸探针传感器的稳定性

其稳定性由测量仪器即频率计和电路的性能所决定。在 25℃、24 h 内漂移 ± 2 Hz; 测量误差为 ± 10 Hz。

2.6 多重核酸探针传感器初步研究结果

结果显示, 固化有 HBV、pBR322 和 HSV-1 混合单链 DNA 的压电晶体传感器检测受检样品中, 含与其中一个探针互补的单链 DNA 的频率值同单核酸探针传感器; 多个核酸探针传感器检测受检样品中含与多个核酸探针互补的 DNA 的频率值同单个核酸探针传感器相比, 无大的差别。

3 讨 论

本文建立的核酸探针传感器的原理基于石英振子的晶体谐振频率是其表面沉积物的函数, 固化在压电晶体上的单链 DNA 依碱基互补原则形成双链时, 晶体谐振频率随之发生变化, 可用简化的 Sauerbrey 方程表示: $\Delta f = -K\Delta M$ (K 为常数), 即晶体质量 m 的增量与振动频率 f 呈负相关 (图 6)^[10]。故核酸杂交后, 其频率值应降低。

吴宗正等^[1]曾研制出压电晶体式核酸探

针传感器, 并检测了鲑鱼精 DNA 杂交前后的变化, 但他们尚未对其特异性、敏感性及响应信号的变化等作进一步探讨。我们的研究结果表明, 核酸探针传感器不同于其他类型的生物传感器, 其响应时间较晚 (图 4), 反映出核酸复性的缓慢动力学过程, 但与其他类型的杂交法相比, 从检测时间上看仍是较快的。特异性与敏感性是核酸杂交技术能否实施的关键。本文建立的核酸探针传感器具有很高的特异性 (表 1), 其结果与斑点杂交法相同^[6]。但其敏感性较低, 仅达 100 pg, 尚需从化学或非化学因素二方面着手改进。杂交后的频率改变 Δf 值随 DNA 浓度逐渐增加呈线性递增, 表明核酸探针传感器能对受检 DNA 样品进行相对定量。

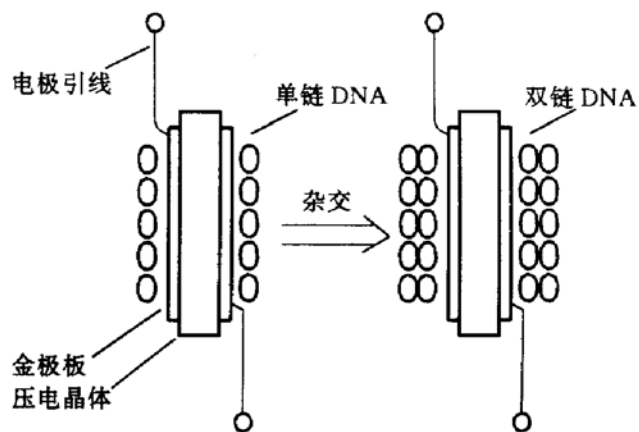


图 6 压电晶体核酸探针传感器的模式图

迄今尚未见到有关多重核酸探针传感器的研究报道。从数学角度考虑, 单个核酸探针分子在压电晶体上所占的面积与整个晶体面积 (0.3 cm^2) 相比, 其极限趋近于零, 这被本实验证实, 即多个核酸探针在一个压电晶体表面固定后, 并不影响其对受检标本中含与单个或多个基因探针互补的 DNA 同源序列的检测结果。这为今后我们进一步研究多个核酸探针固定于压电晶体表面, 即用于临床血源筛选或环境污染检测的多重核酸探针传感器的研制打下基础。

现有的核酸杂交检测法包括 Graham 和 Millan 等^[2,3]建立的光纤型 DNA 生物传感器均以放射性同位素或非放射性物质标记 DNA

进行实验的. 本文建立的核酸探针传感器的特点是将单链 DNA 直接固化在压电晶体上, 无需用放射性同位素或非放射性物质标记, 显示了一定的优越性.

此外, 能否使单链 DNA 较多并牢固地结合于压电晶体上, 也是核酸探针传感器的关键, 我们采用台湾吴宗正等的方法^[1]并略加修改获得了能将约 50% DNA 固定于晶体表面的良好结果, 说明 1 μg 目的 DNA 对于核酸探针传感器的构建是足够的. 固化有单链 DNA 的压电晶体杂交后尚可经变性再生, 而并不影响 DNA 与晶体的交联程度, 这不仅为核酸探针传感器实用化奠定了基础, 也为基因分离提供了一定资料.

稳定性也是影响此技术测定的主要因素之一. 在测量过程中由于受诸多因素的影响, 会产生不稳定性、频率发生漂移, 从而影响测量的准确性. 本实验采用了参比差动测量的方法, 用晶振 XTAL1 作为参比传感器, XTAL2 为核酸传感器, 传感器基体的材料是完全相同的, 从而受影响的变化也是相同的, 所以在测量中其不稳定因素被减小到最低程度, 理论上可忽略不计. 但实际测量中仍有漂移 (25 $^{\circ}\text{C}$, 24 h $\pm$ 2 Hz), 特别是测量误差达 $\pm$ 10 Hz, 致使我们将 Δf 变化超过 10 Hz 者才定为阳性结果, 这尚需进一步完善.

参 考 文 献

- 1 吴宗正, 王西华, 欧乐君. 中华民国微生物杂志, 1990; 23: 147

- 2 Graham C R, Leslie D, Squirrell D J. Biosensors and Bioelectronics, 1992; 7 (7): 487
- 3 Millan K M, Mikkelsen S R. Anal Chem, 1993; 65 (7): 2317
- 4 Millan K M, Saraullo A, Mikkelsen S R. Anal Chem, 1994; 66 (18): 2943
- 5 陈誉华, 洪文廉, 陈庆学等. 中国公共卫生学报, 1991; 10 (4): 248
- 6 陈誉华, 刘 军, 陈庆学等. 中国医科大学学报, 1993; 21 (增刊): 12
- 7 宋艾芝, 赵玉坤, 刘 军等. 中华儿科杂志, 1992; 30 (1): 14
- 8 Vonsover A, Leventon-Kriss S, Langer A *et al.* J Med Virol 1987; 21 (1): 57
- 9 侯云德主编. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 160~164
- 10 Sauerbrey G A. Anal Chem, 1983; 55: 1682

Study on Nucleic Acid Probe Sensor. .Chen Yuhua, Song Jindan, Li Dawei (Key Laboratory of Cell Biology, China Medical University, Ministry of Public Health of China, Shenyang 110001, China).

Abstract A new nucleic acid hybridizing assay, piezoelectric quartz-sensor which is capable of quantitative analysis has been established on the basis that the frequency of piezoelectric quartz vibration is the function to its surface sediment. The technique is simple, specific and sensitive up to 100 pg. It uses the rapid, sensitive frequency messages as the demonstration system of nucleic acid hybridization.

Key words nucleic acid hybridization, biosensor, piezoelectric quartz

胸腺腺苷脱氨酶免疫亲和纯化和性质研究*

罗时文 李金生 沈静娴 邹国林¹⁾

(江西医学院生物化学教研室, 南昌 330006)

摘要 用免疫亲和层析结合常规生化方法从人胸腺中纯化腺苷脱氨酶达电泳纯, 比活力 14898 U/mg,

*江西省自然科学基金资助项目. ¹⁾武汉大学生命科学学院.

收稿日期: 1995-12-04, 修回日期: 1996-05-14